

牛轮状病毒单克隆抗体的制备及其应用

何孔旺 林继煌 江杰元 沈江萍 黄宝顺

(江苏省农科院畜牧兽医研究所, 南京 210014)

李保同 杨毓华

(南京部队南京总医院微生物科)

提 要

以纯化浓缩的 HN-7 株牛轮状病毒(牛 RV, 从河南腹泻犊黄牛粪样中分离)作为免疫原, 免疫 Balb/c 小鼠, 取其脾细胞与同系小鼠骨髓瘤细胞 SP 2/0 融合, 经克隆化筛选出 2 株(2C₇ 和 3C₉) 具群特异性的单克隆杂交瘤细胞株。2C₇ 与 3C₉ 的小鼠腹水单克隆抗体(McAb) 与牛 HN-7、BRV007、BRV014 及 NCDV, 猪 Na86, 猴 SA-11 和人 Wa 株 RV 细胞培养物的间接 ELISA 反应效价均达 1 : 10⁶, 但它们的 HI 和 NT 滴度分别 ≤ 1 : 8 和 ≤ 1 : 100。McAb 的 Ig 类别和 IgG 亚类检测结果 2C₇ 为 IgG1, 3C₉ 为 IgG2b。分别用 3C₉ McAb 和多克隆抗血清(PcAb) 包被微量反应板进行粪样中 RV 抗原检测, 共检测犊黄牛腹泻粪样 36 份、婴幼儿腹泻粪样 40 份, McAb 和 PcAb 两系统检测结果的符合率分别达到 97.2% (35/36) 和 100% (40/40)。

关键词: 轮状病毒 单克隆抗体 群特异性

轮状病毒病是一种重要的人兽共患病毒病。八十年代以来, 我国医务和兽医工作者日益重视该病的研究, 在 RV 的分离培养、检测诊断等方面取得了长足的进步, 但有关 RV 单克隆抗体的研制, 迄今尚未见正式文献。本研究用从国内分离的牛 RV 作为免疫原, 获得了 2 株能稳定分泌具群特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 现报道如下。

材 料 与 方 法

一、病毒

牛 RV HN-7、BRV007 和 BRV014 以及猪 Na86 均由江苏省农科院畜牧兽医所从腹泻牛、猪粪样中分离^[1-3]。牛 NCDV (中国兽药监察所赠)、猴 SA-11 及人 Wa 株 (浙江医科大学赠) 分别为牛、猴、人 RV 国际参考毒株。

二、病毒的增殖与纯化

按 Gaul^[4] 的方法增殖病毒。牛 RV HN-7 培养物与等量胰蛋白酶 (1000 μg/ml, Difco) 混合作用后, 接种 MA-104 细胞, 待产生 75% 以上 CPE 时收获。反复冻融三次。6000 r/m, 离心 60 分钟, 除去细胞碎片。上清再经 40000 r/m, 离心 90 分钟。沉淀物用少许 (原液的 1/20) PBS 带

本文于 1990 年 1 月 20 日收到

释, 作为免疫原。

三、小鼠的免疫和细胞融合

纯化的病毒 (100 μ g/ml) 与等量福氏完全佐剂混匀充分乳化, 腹腔注射 Balb/c 雌性小鼠, 每只 0.2ml。首免后 2 星期, 腹注纯化毒 0.1ml (100 μ g/ml), 再隔 4 星期, 行第三次免疫, 腹注与第二次等量的纯化毒。4 天后, 取免疫小鼠脾细胞与 SP 2/0 细胞 (10:1) 融合。10—14 天, 待克隆板小孔中克隆基本长满后, 取上清检测。阳性克隆扩大培养并作有限稀释。亚克隆两次以上。

四、腹水型 McAb 的制备

杂交瘤细胞 $1\sim 2 \times 10^6$, 接种预注入 0.2ml 石蜡油的 Balb/C 小鼠腹腔。7—10 天, 收集其腹水, 进行检测和鉴定。

五、间接 ELISA 筛选阳性克隆和测定腹水

微量反应板用 1:2000 稀释的兔抗牛 RV IgG (自备) 包被, 10% 小牛血清封闭后, 加入 RV 感染的 MA-104 细胞培养物, 并同时于第二排设未接毒的正常 MA-104 细胞对照。加待测样品 (克隆上清或适当稀释的腹水), 再加酶标羊抗鼠 (工作浓度 1:1000, 自备), TMB-H₂O₂ 显色, 用 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。于 DG-III 型酶联免疫检测仪上测 OD₄₅₀, 比较各样品加病毒孔与正常细胞孔的 OD 值, 比值 ≥ 3 的样品判为阳性。

六、血凝抑制 (HI) 试验

参照何家惠^[6]的方法在 V 型微量血凝板上进行。待检腹水或克隆上清经倍比稀释后, 加 4 个血凝单位的病毒抗原。

七、中和试验 (NT)

按 Sato 氏^[6]法, 在微量细胞板上进行致细胞病变中和试验。以能完全抑制细胞病变的样品最高稀释度为其抑制价。

八、McAb 类别的检测

收集杂交瘤细胞的无血清培养液, 用 PEG 6000 浓缩 20 倍, 与羊抗 Balb/c 鼠 IgM 和 IgG 亚类抗血清进行琼脂糖双扩散试验。

九、夹心 ELISA 检测 RV 抗原

分别用兔抗 RV IgG (PcAb) 和纯化的 McAb 3C9 包被微量反应板, 加入待检粪便样品, 再加酶标兔抗 RV IgG, 用 TMB-H₂O₂ 显色后, 加 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。

结 果

一、McAb 的制备

免疫小鼠的血清经反向间接血凝抑制 (RIHI) 试验^[7]检测效价为 1:640—1280。取该小鼠脾细胞与 SP 2/0 骨髓瘤细胞融合。37 $^{\circ}$ C, 7% CO₂ 孵箱培养。杂交瘤生长孔率为 97.9%, 经间接 ELISA 法筛选, RV 抗体阳性率为 8.5% (共 40 株)。通过有限稀释克隆化后获得 2 株 (2C7 和 3C9) RV 反应阳性的单克隆杂交瘤细胞株。其中 2C7 克隆化 2 次, 3C9 克隆化 3 次, 最终的克隆孔阳性率均达 100%。制备 2 株杂交瘤细胞的小鼠腹水。

二、2C7 和 3C9 McAb 对 RV 不同毒株的反应

用 4 株牛、1 株猪、1 株猴和 1 株人源 RV 分别与 2C7 和 3C9 McAb 进行间接

表 1 2C₇ 和 3C₉ McAb 对 RV 不同毒株的反应
Table 1 Titers of 2C₇ and 3C₉ McAbs to different strains of RV by HI, NT and indirect ELISA

Rotavirus strain	Origin	Antigenic property			HI titer		NT titer		Indirect ELISA titer	
		Group	Sub-group	Serotype	2C ₇	3C ₉	2C ₇	3C ₉	2C ₇	3C ₉
					2C ₇	3C ₉	2C ₇	3C ₉		
HN-7	Henan Bovine	A	I	?	4	8	100	100	4 × 10 ⁵	8 × 10 ⁵
BRV007	Anhui Bovine	A	I	?	2	4	100	100	4 × 10 ⁵	4 × 10 ⁵
BRV014	Anhui Bovine	A	I	?	4	4	50	100	2 × 10 ⁵	4 × 10 ⁵
NCDV	U.S.A. Bovine	A	I	6	4	8	50	50	2 × 10 ⁵	8 × 10 ⁵
Na86	Jiangsu Porcine	A	I	?	4	4	<10	<10	4 × 10 ⁵	4 × 10 ⁵
SA-11	U.S.A. Simian	A	I	3	2	4	<10	<10	1 × 10 ⁵	2 × 10 ⁵
Wa	U.S.A. Human	A	II	1	2	2	<10	<10	1 × 10 ⁵	1 × 10 ⁵

* No serotyping

ELISA、HI 和 NT, 结果见表 1。2C₇ 和 3C₉ McAb 均无明显的血凝抑制作用, 中和抑制作用亦比较弱。但两株 McAb 与上述属于不同血清型(1、3、6型)、不同亚群(I、II亚群)而同属 A 群(组)的 7 株 RV 的间接 ELISA 反应效价均 ≥ 1 : 1 × 10⁵。

三、McAb 的 Ig 类别及 IgG 亚类鉴定

用羊抗鼠 IgM 和 IgG 亚类的抗血清进行琼脂双扩散, 证明 2C₇ 和 3C₉ 分别属于小鼠 IgG₁ 和 IgG_{2b} 亚类。

四、McAb-ELISA 检测 RV 抗原

用 3C₉ McAb 和 PcAb 分别包被微量反应板进行 ELISA 检测粪样中 RV 抗原, 共检测犊黄牛腹泻 36 份粪样, 婴幼儿腹泻粪样 40 份。结果 36 份牛粪样中有一份 McAb-ELISA

表 2 McAb-ELISA 和 PcAb-ELISA 检测结果的比较
Table 2 Result of RV detection by McAb-ELISA and PcAb-ELISA

PcAb-ELISA		McAb-ELISA				Total	
		+		-		Human	Bovine
		Human	Bovine	Human	Bovine		
+		25	19	0	0	25	19
-		0	1	15	16	15	17
Total		25	20	15	16	40	36

表现为阴性的样品在 PcAb-ELISA 中为阳性, 其它 35 份以及所有人粪样的检测结果两系统完全一致, 详见表 2。两者的符合率分别达 97.2% 和 100%。

讨 论

RV 抗原组分比较复杂, 结构蛋白主要有 VP₃、VP₆ 和 VP₇^[8]。其中 VP₃ 为外衣壳血凝素抗原^[9], 并决定病毒对感染宿主范围的限制^[10], VP₇ 是决定血清型和主要中和特异性的外衣壳蛋白, 为产生中和抗体的主要抗原^[10], 而 VP₆ 则是 RV 内衣壳的主要结构蛋白, 它决定 RV 的群 (group) 和亚群 (subgroup) 特异性^[11]。本研究所获得的 2C7 和 3C9 McAb 对分别属于第 I 亚群 (4 株牛 RV, 猪 Na86 及猴 SA-11) 和第 II 亚群 (人 Wa) 的 7 株 A 群 RV 的血凝抑制作用和中和作用都非常弱, 但两株 McAb 与所有 RV 株的间接 ELISA 反应效价均达到 1 : 10⁵ 或以上, 表明 2C7 和 3C9 McAb 都是针对 RV 共同群抗原 (即 VP₆) 的。

用 3C9 McAb 代替 PcAb 进行 ELISA 检测牛、人腹泻粪样中的 RV 抗原, 结果用 McAb 和 PcAb 的符合率分别达到 97.2% (35/36) 和 100% (40/40), 显示了良好的应用前景。

RV 群特异性 McAb 研制成功为我国 RV 的抗原组分及血清分型的研究提供了有效的手段。但针对 VP₇ (决定血清型和中和作用)、VP₃ (血凝素) 及亚群特异性抗原的 McAb 尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 丁再棟等, 1984, 畜牧与兽医, 16(5): 193.
- [2] 何孔旺等, 1988, 江苏农业科学, 11: 35.
- [3] 何孔旺等, 1989, 畜牧与兽医, 21(2): 64.
- [4] Gaul S.K. et al., 1982, *J Clin Microbiol*, 16: 495.
- [5] 何家惠等, 1987, 中国人兽共患病杂志 3(5): 16.
- [6] Sato K et al., 1982, *Arch Virol*, 73: 45.
- [7] 何孔旺等, 1989, 病毒学报, 5(1): 68.
- [8] Kalica A.R. et al., 1981, *Infect Immun*, 33: 958.
- [9] Kalica A.R. et al., 1983, *Virology*, 125: 194.
- [10] Greenberg H.B. et al., 1983, *J Virol*, 47: 267.
- [11] Kalica A.R. et al., 1981, *Virology*, 112: 385.

Preparation and Application of Monoclonal Antibodies to Bovine Rotavirus

He Kong-wang Lin Ji huang

Jiang Jie-yuan Sheng Jiang-ping Huang Bao-shun

*(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Jiangsu Academy
of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)*

Li Bao-tong Yiang Yu-hua

(Department of Microbiology, Nanjing General Hospital, Nanjing Corps 210014)

Two monoclonal antibodies (McAb, 2C7 and 3C9) were obtained by fusion of SP 2/0 myeloma cells with spleen cells from Balb/c mice immunized with rotavirus (RV) of HN-7 strain isolated from diarrheal calf in Henan Province. All the two McAbs reacted with the common group antigen of A-group RV, because the titers of two ascite McAbs were up to 1×10^5 or above by indirect ELISA with RV of Bovine HN-7, BRV007, BRV014 and NCDV, Porcine Na86, Simian SA-11 and Human Wa strain, but were $\leq 1 : 8$ and $\leq 1 : 100$ respectively by HI and NT. According to double diffusion test of agar, 2C7 McAb was identified as mouse IgG1 subclass and 3C9 was IgG2b subclass. The correspondent rates of ELISA with 3C9 McAb and PcAb detecting RV antigen in fecal samples of diarrheal calves and babies were 97.2% (35/36) and 100% (40/40).

Key words: Rotavirus Monoclonal antibody Group specificity